



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

REC'D 05 NOV 2004
WIPO PCT

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 15 JUIN 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété Industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

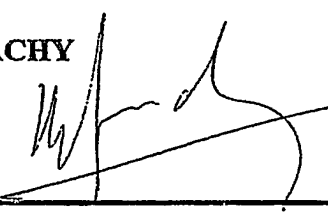
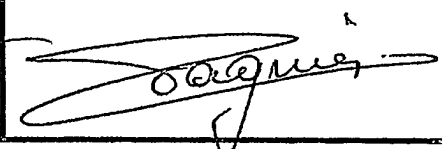
INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>12 JUIN 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0307095</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>12 JUIN 2003</b>		<b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  <b>GROSSET-FOURNIER &amp; DEMACHY</b> <b>54, rue Saint-Lazare</b> <b>F-75009 Paris</b>	
Vos références pour ce dossier (facultatif) <b>IFB 03 BH CNR CD25</b>			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2</b> NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date ____ / ____ / ____ N° _____ Date ____ / ____ / ____	
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<input type="checkbox"/> N° _____ Date ____ / ____ / ____	
<b>3</b> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)  <b>NOUVELLES SEQUENCES PHOSPHORYLEES DE LA PHOSPHATASE CD25B, ANTICORPS DIRIGES          CONTRE CES SEQUENCES AINSI QUE LEUR UTILISATION</b>			
<b>4</b> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____ / ____ / ____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____ / ____ / ____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____ / ____ / ____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5</b> DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		<b>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE</b>	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	<b>3, rue Michel-Ange</b>	
	Code postal et ville	<b>F-75794 PARIS CEDEX 16</b>	
Pays		<b>FRANCE</b>	
Nationalité		<b>FRANCAISE</b>	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE LIEU <b>12 JUIN 2003</b> <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI <b>0307095</b>		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 260899
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		<b>IFB 03 BH CNR CD25</b>	
<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom			
Prénom		<b>DEMACHY</b>	
Cabinet ou Société		<b>Charles</b> <b>GROSSET-FOURNIER &amp; DEMACHY</b>	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	<b>54, rue Saint-Lazare</b>	
	Code postal et ville	<b>75009 PARIS</b>	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		<b>01.42.81.09.58</b>	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		<b>01.42.81.08.71</b>	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <b>Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</b>	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		<b>Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)</b>	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		<b>Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) <b>Charles DEMACHY</b> <b>Mandataire</b> <b>422.5/PP.170</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  	

## NOUVELLES SÉQUENCES PHOSPHORYLÉES DE LA PHOSPHATASE CD25B, ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE CES SÉQUENCES AINSI QUE LEUR UTILISATION

La présente invention a pour objet de nouvelles séquences phosphorylées de la phosphatase CD25B ainsi que des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre ces séquences. La présente invention a également pour objet l'utilisation de ces nouvelles séquences phosphorylées notamment pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal.

Les mécanismes qui contrôlent la division des cellules mettent en jeu de nombreux acteurs dont les activités sont régulées par des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation, impliquant des kinases et des phosphatases. Des dérégulations de ces mécanismes ont été identifiées dans de nombreux cancers. Leur identification et leur caractérisation ouvrent aujourd'hui de nouvelles perspectives pour le diagnostic et le traitement de la maladie cancéreuse.

CDC25B est une phosphatase régulatrice du cycle cellulaire essentielle pour le contrôle de l'entrée en mitose. Elle appartient à une famille qui compte trois membres codés par des gènes différents (CDC25A, B et C) chez les mammifères. La protéine CDC25B est exprimée et active en fin de phase G2 du cycle cellulaire (Baldin et al., 1997 ; Gabrielli et al., 1996). Sa localisation intracellulaire est régulée par des séquences NES et NLS (Davezac et al., 2000) et par son interaction avec les protéines 14-3-3 (Mils et al., 2000 ; Forrest et al., 2001). Il a été suggéré que CDC25B puisse agir comme un "starter" des événements mitotiques précoces (Nilsson et al., 2000). Elle pourrait jouer un rôle dans l'activation initiale d'une population de CDC2/cycline B au niveau du centrosome avant sa translocation nucléaire (Kumagai et al., 1992 ; Hoffmann et al., 1993). CDC25B active les complexes CDK/cycline pour permettre les remaniements architecturaux et biochimiques qui sont nécessaires pour permettre le processus de division cellulaire. Son activité est régulée par les variations de son expression, par son association à des partenaires régulateurs et par des événements de phosphorylation.

La protéine kinase Aurora A, également connue sous le nom de STK5, est surexprimée dans de nombreuses tumeurs du sein. Cette expression est corrélée avec un haut grade tumoral (Bischoff et al., 1998 ; Zhou et al., 1998). Cette kinase est codée par

le gène STK15 localisé que le locus 20q13, un amplicon présent dans de nombreuses tumeurs. Cette protéine est localisée au niveau du centrosome (Dutertre et al., 2002). Sa fonction semble importante pour la séparation des centrosomes (Giet et al., 2000), leur duplication (Zhou et al., 1998) et l'assemblage d'un fuseau mitotique bipolaire (Giet et al., 2000). L'inhibition de sa fonction par la technologie de l'ARN interférence conduit à la formation de fuseaux monopolaires et sa surexpression est responsable d'une amplification centrosomale et d'une polyploïdisation (Meraldi et al., 2002 ; Bischoff et al., 1998 ; Zhou et al., 1998).

A ce jour, l'identification des substrats de la kinase Aurora A est encore très parcellaire. La phosphatase CD25B est le premier substrat identifié qui est également co-localisé au niveau des centrosomes et joue un rôle clair dans le contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération.

La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du site de phosphorylation *in vitro* de la phosphatase CD25B par la kinase Aurora A, et de l'identification de la séquence phosphorylée du variant d'épissage CD25B3 de CD25B sur le résidu sérine en position 353.

L'un des buts de la présente invention consiste à fournir de nouvelles séquences phosphorylées des différents variants de la phosphatase CD25B.

Un autre but de l'invention consiste à fournir un nouvel anticorps dirigé contre une phosphatase CD25B phosphorylée, ledit anticorps pouvant être utilisé dans le cadre d'un diagnostic médical, ou pour la préparation de cribles pour l'identification de molécules liant ladite séquence phosphorylée et susceptibles de représenter de nouveaux agents utilisables en pharmacologie anti-tumorale.

Un autre but de l'invention consiste à fournir un nouvel outil pour l'étude des mécanismes moléculaires qui conduisent à la polyploïdisation et à la transformation cellulaire, ainsi qu'un nouvel outil permettant la mise en évidence de l'activité de la kinase Aurora A sur un de ses substrats physiologiques, et par conséquent l'identification d'éventuelles perturbations quantitatives, temporelles et spatiales de cette activité.

La présente invention concerne une séquence peptidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par un fragment d'au moins environ 10 acides aminés issus de la séquence SEQ ID NO : 1 suivante :

TPVQNKRRRS<sub>p</sub>VTPPEEQQE

SEQ ID NO : 1

dans laquelle le résidu sérine en position 10 est phosphorylé, notamment par traitement *in vitro* de la séquence SEQ ID NO : 1 par la kinase Aurora A, ledit fragment susmentionné contenant ledit résidu sérine phosphorylé.

L'expression "résidu phosphorylé" désigne un acide aminé porteur d'un groupement phosphate.

La présente invention concerne également une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la séquence SEQ ID NO : 2 suivante :

QNKRRRS<sub>p</sub>VTPPEEQ

SEQ ID NO : 2

dans laquelle le résidu sérine en position 7 est phosphorylé.

La séquence SEQ ID NO : 2 correspond à un fragment de la séquence SEQ ID NO : 1 susmentionnée. Plus exactement, elle correspond au fragment de SEQ ID NO : 1 délimité de l'acide aminé en position 4 à l'acide aminé en position 17.

La présente invention concerne également une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par l'une des séquences suivantes :

- la séquence SEQ ID NO : 3, représentant le variant d'épissage CD25B1 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 339 est phosphorylé,

- la séquence SEQ ID NO : 4, représentant un variant d'épissage CD25B2 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 312 est phosphorylé,

- la séquence SEQ ID NO : 5, représentant un variant d'épissage CD25B3 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 353 est phosphorylé,

- la séquence SEQ ID NO : 6, représentant un variant d'épissage CD25B4 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 374 est phosphorylé,

– la séquence SEQ ID NO : 7, représentant un variant d'épissage CD25B5 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 361 est phosphorylé.

La présente invention concerne également un anticorps polyclonal ou monoclonal susceptible de reconnaître une séquence peptidique telle que définie précédemment.

Un anticorps polyclonal avantageux de l'invention est caractérisé en ce qu'il est susceptible de reconnaître la séquence SEQ ID NO : 2 telle que définie ci-dessus.

Un tel anticorps dirigé contre l'épitope phosphorylé de séquence SEQ ID NO : 2 est généré en immunisant des lapins avec ledit épitope.

Plus précisément, ledit épitope est couplé de façon covalente avec une protéine porteuse telle que l'hémocyanine, le BSA ou l'ovalbumine. Les lapins sont alors immunisés pendant 3 mois (4 injections au total) et la saignée finale permet la récupération d'environ 50 ml de sérum. Le sérum est ensuite doublement purifié par affinité sur une colonne de peptide phosphorylé puis sur une colonne de peptide non phosphorylé.

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un anticorps monoclonal tel que défini ci-dessus, dirigé contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

– l'immunisation d'un animal par injection de la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie ci-dessus,

– la fusion entre des myélomes d'un animal et des splénocytes d'un animal afin d'obtenir des hybridomes,

– la mise en culture des hybridomes ainsi obtenus,

– la récupération et purification par clonage d'un hybridome, choisi parmi ceux obtenus à l'étape précédente et sécrétant un anticorps dirigé contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie ci-dessus.

L'animal utilisé pour l'étape d'immunisation est notamment une souris.

Les myélomes utilisés pour la fusion proviennent notamment une souris.

Les splénocytes utilisés pour la fusion proviennent d'un animal de la même espèce que celle dont provient les myélomes, à savoir notamment une souris.

On choisit les hybridomes qui sécrètent les anticorps contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 sur la base de la production d'anticorps capables de

reconnaître dans un test ELISA le peptide phosphorylé utilisé pour l'immunisation mais pas le peptide non phosphorylé.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active une séquence peptidique telle que définie précédemment, un anticorps tel que défini ci-dessus, ou un anticorps anti-idiotypique tel que défini ci-dessus, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

Une composition pharmaceutique avantageuse selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active la séquence peptidique représentée par la séquence SEQ ID NO : 2.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, d'un anticorps tel que défini ci-dessus, ou d'un anticorps anti-idiotypique tel que défini ci-dessus, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de cancers, tels que les cancers du sein.

La présente invention concerne également l'utilisation d'un anticorps tel que défini ci-dessus, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal, notamment de cancers du sein.

Selon un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne l'utilisation d'un anticorps polyclonal tel que défini ci-dessus, dirigé contre l'épitope phosphorylé de séquence SEQ ID NO : 2, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal, notamment de cancers du sein.

La présente invention concerne également une méthode de diagnostic *in vitro* de cancers, notamment de cancers du sein, chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en présence d'un anticorps tel que défini ci-dessus, avec un échantillon biologique prélevé chez un individu, ledit anticorps étant le cas échéant fixé sur un support solide,

- la détection d'une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique à l'aide de réactifs marqués, notamment d'anticorps marqués, reconnaissant soit l'anticorps lié à ladite séquence peptidique, soit la séquence peptidique liée audit anticorps dans les complexes formés lors de l'étape précédente entre l'anticorps et la séquence peptidique susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et ce, le cas échéant, après rinçage approprié du support solide.



La présente invention concerne également une méthode de pronostic *in vitro* de cancers, notamment de cancers du sein, chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

– la mise en présence d'un anticorps tel que défini ci-dessus, avec un échantillon tumoral prélevé chez un individu, ledit anticorps étant le cas échéant fixé sur un support solide,

– la détection d'une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique à l'aide de réactifs marqués, notamment d'anticorps marqués, reconnaissant soit l'anticorps lié à ladite séquence peptidique, soit la séquence peptidique liée audit anticorps dans les complexes formés lors de l'étape précédente entre l'anticorps et la séquence peptidique susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et ce, le cas échéant, après rinçage approprié du support solide.

La présente invention concerne également l'utilisation des anticorps susmentionnés de l'invention dirigés contre une séquence phosphorylée de CD25B dans le cadre de la mise en œuvre d'un test de diagnostic visant à détecter sur des prélèvements tumoraux la présence ou non de cette séquence phosphorylée, ceci dans un but diagnostique ou pronostique.

La présente invention concerne également un procédé de criblage d'une molécule capable de se lier à une séquence peptidique telle que définie ci-dessus, ladite molécule étant susceptible d'être utilisée comme agent anti-tumoral ou agent anti-prolifératif tant sur les cellules en culture que chez un organisme vivant ou encore contre des agents infectieux (parasites, champignons pathogènes), caractérisé en ce qu'il comprend :

– la mise en présence de ladite molécule avec la séquence peptidique susmentionnée, et

– la détection de la liaison de ladite molécule par l'utilisation de méthodes de compétition appropriées, notamment par la compétition vis-à-vis de la liaison d'un anticorps tel que défini ci-dessus.

La liaison entre ladite molécule avec la séquence peptidique phosphorylée peut être détectée selon le procédé suivant : la séquence phosphorylée (substrat phosphorylé) est liée à un support solide ; l'incubation avec l'anticorps susmentionné en solution permet ensuite sa fixation qui est révélée par l'utilisation d'un anticorps secondaire porteur d'un chromophore ou par le marquage direct de l'anticorps primaire (anticorps de l'invention dirigé contre la séquence phosphorylée). L'incubation simultanée avec un composé capable de lier ladite séquence phosphorylée entraîne sa fixation et le

masquage du site reconnu par l'anticorps. La visualisation de cette interaction pourra donc être réalisée et quantifiée par la baisse de liaison de l'anticorps.

La présente invention est davantage illustrée dans la description détaillée qui suit de la démonstration du fait que la kinase Aurora A recombinante phosphoryle CDC25B3 sur la sérine 353, et de la production d'anticorps contre la protéine CDC25B phosphorylée par la kinase Aurora A.

### A) DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1 représente un spectre de masse du peptide monophosphorylé, 353-S<sub>(p)</sub>VTPPEEQQEAEPPK-367. L'axe des abscisses correspond au rapport m/z et l'axe des ordonnées correspond au pourcentage d'abondance relative.

Les Figures 2A, 2B et 2C représentent les résultats d'analyses western blot avec l'anticorps monoclonal SE96 (Figure 2A), avec l'anticorps anti- $\alpha$ MBP (New England Biolabs)(Figure 2B) et avec l'anticorps anti- $\alpha$ Aurora A (voir demande de brevet français 02/07212)(Figure 2C). Dans ces Figures, la première colonne correspond à la protéine kinase Aurora A ; la seconde colonne à une protéine recombinante MBP-CDC25B ; la troisième colonne correspond à la protéine kinase Aurora A et à la protéine recombinante MBP-CDC25B et la quatrième colonne correspond à MBP seule.

Les Figures 3a à 3h représentent des images d'immunofluorescence indirecte réalisées sur des cellules HeLa avec l'anticorps SE96.

Dans les Figures 3a, 3c, 3e et 3g, les cellules HeLa ont été fixées et utilisées pour effectuer une analyse par immunofluorescence avec les anticorps SE96 et elles ont également été colorées avec du DAPI.

Dans les Figures 3b, 3d, 3f et 3h, les cellules HeLa ont été fixées et utilisées pour effectuer une analyse par immunofluorescence avec les anticorps SE96.

Les cellules HeLa des Figures 3c et 3d ont été mises en compétition avec le peptide phosphorylé ayant servi à l'immunisation (SEQ ID NO : 2) ; les cellules HeLa des Figures 3e et 3f ont été mises en compétition avec le peptide non phosphorylé (QNKR RRSVTPPEEQ) ; et les cellules HeLa des Figures 3g et 3h ont été mises en compétition avec un peptide phosphorylé sans rapport avec la sérine 353 (MEVBELS<sub>(p)</sub>PLALGR).

Ces Figures démontrent que le marquage observé avec l'anticorps SE96 est bien éliminé par le peptide immunogène sous sa forme phosphorylée, mais pas par le même peptide non phosphorylé. Par ailleurs, un peptide phosphorylé irrelevant n'a aucun effet compétiteur, démontrant la spécificité vis-à-vis de la séquence phosphorylé et non de la présence du groupement phosphate uniquement.

## B) METHODES ET RESULTATS

### La kinase Aurora A recombinante phosphoryle CDC25B3 sur la sérine 353

La protéine recombinante CDC25B3 est phosphorylée *in vitro* par la kinase recombinante Aurora A. Le produit de la réaction de phosphorylation a été analysé par spectrométrie de masse après excision du gel d'électrophorèse et digestion tryptique. Le spectre MS/MS du peptide monophosphorylé, 353-SVTPPEEQQEAEPPK-367 est présenté en Figure 1. Son analyse indique que c'est la sérine 353 qui est phosphorylée par la kinase.

De même, il a été montré que la kinase Aurora A recombinante phosphoryle CDC25B1 sur la sérine 339, CDC25B2 sur la sérine 312, CDC25B4 sur la sérine 374 et CDC25B5 sur la sérine 361.

### Production d'anticorps contre la protéine CDC25B phosphorylée par la kinase Aurora A

Le peptide de séquence QNKRRRS(p)VTPPEEQ (SEQ ID NO : 2) a été utilisé pour l'immunisation de lapins. Après sacrifice des animaux, le sérum a été purifié par chromatographie en deux étapes : la première sur une colonne de peptide phosphorylé pour retenir les anticorps spécifiques, puis la deuxième sur une colonne du même peptide non phosphorylé de séquence QNKRRRSVTPPEEQ, de manière à purifier dans l'éluat les anticorps spécifiques de la forme phosphorylée. La reconnaissance du peptide phosphorylé par les anticorps a été validée dans un test ELISA. Dans la suite du document, ces anticorps seront désignés sous le nom de SE96.

### L'anticorps SE96 reconnaît CDC25B phosphorylé par Aurora A

Des protéines recombinantes CDC25B-MBP (Maltose Binding protein) ou MBP seule ont été incubées en présence ou non de kinase Aurora A. Les échantillons ont ensuite été analysés par transfert de protéines (western blot) avec l'anticorps SE96 et

des anticorps permettant la reconnaissance de la MBP et d'Aurora A. Comme le montre la Figure 2, la protéine CDC25B phosphorylée par Aurora A est reconnue par SE96, ce qui valide l'utilisation de cet anticorps dans un test Western blot.

#### La protéine CDC25B phosphorylée sur la sérine 353 est localisée au niveau du centrosome

Des cellules HeLa ont été fixées et utilisées pour effectuer une analyse par immunofluorescence avec les anticorps SE96. Les cellules ont également été colorées avec le 4'-6 diamino-2-phénylindole (DAPI) pour localiser le noyau. Les images présentées à la Figure 3 sont représentatives d'observations sur un grand nombre de cellules. Elles indiquent que la protéine CDC25B phosphorylée sur la sérine 353 est localisée au niveau des centrosomes des cellules en mitose. Ce marquage est aboli lorsqu'une compétition est réalisée avec le peptide phosphorylé ayant servi à l'immunisation (SEQ ID NO : 2), mais pas avec le peptide non phosphorylé (QNKRRRSVTPPEEQ) ni avec un peptide phosphorylé sans rapport avec la sérine 353 (MEVEELS(p)PLALGR). Ces observations valident l'utilisation de ce réactif en immunofluorescence.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baldin, V., Cans, C., Superti-Furga, G. & Ducommun, B (1997) Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? *Oncogene*, **14**, 2485-2495,
- Bischoff, J. R. et al. (1998) A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers, *EMBO J*, **17**, 3052-65,
- Davezac, N. et al. (2000) Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization, *Oncogene*, **19**, 2179-85,
- Dutertre, S., Descamps, S. & Prigent, C. (2002) On the role of aurora-A in centrosome function, *Oncogene*, **21**, 6175-83,
- Forrest, A. & Gabrielli, B. (2001) Cdc25B activity is regulated by 14-3-3, *Oncogene*, **20**, 4393-401,
- Gabrielli, B. G. et al. (1996) Cytoplasmic accumulation of CDC25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells, *J. Cell. Science*, **109**, 1081-1093,

- Giet, R. & Prigent, C. (2000) The *Xenopus laevis* aurora/Ip11p-related kinase pEg2 participates in the stability of the bipolar mitotic spindle, *Exp Cell Res*, **258**, 145-51,
- Giet, R. et al. (2002) *Drosophila* Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules, *J Cell Biol*, **156**, 437-51,
- Hoffmann, I., Clarke, P., Marcote, M. J., Karsenti, E. & Draetta, G. (1993) Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self amplification of MPF at mitosis, *EMBO J*, **12**, 53-63,
- Kumagai, A. & Dunphy, W. (1992) Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts, *Cell*, **70**, 139-151,
- Meraldi, P., Honda, R. & Nigg, E. A. (2002) Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells, *Embo J*, **21**, 483-92,
- Mils, V. et al. (2000) Specific interaction between 14.3.3 isoforms and the human CDC25B phosphatase, *Oncogene*, **19**, 1257-1265,
- Nilsson, I. & Hoffmann, I. (2000) Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family, *Prog Cell Cycle Res*, **4**, 107-14,
- Zhou, H. et al. (1998) Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation, *Nat Genet*, **20**, 189-93.

## REVENDICATIONS

1. Séquence peptidique caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par un fragment d'au moins environ 10 acides aminés issus de la séquence SEQ ID NO : 1 suivante :

TPVQNKRRRS<sub>p</sub>VTPPEEQQE

SEQ ID NO : 1

dans laquelle le résidu sérine en position 10 est phosphorylé,  
ledit fragment susmentionné contenant ledit résidu sérine phosphorylé.

2. Séquence peptidique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la séquence SEQ ID NO : 2 suivante :

QNKRRRS<sub>p</sub>VTPPEEQ

SEQ ID NO : 2

dans laquelle le résidu sérine en position 7 est phosphorylé.

3. Séquence peptidique selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par l'une des séquences suivantes :

– la séquence SEQ ID NO : 3, représentant le variant d'épissage CD25B1 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 339 est phosphorylé,

– la séquence SEQ ID NO : 4, représentant un variant d'épissage CD25B2 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 312 est phosphorylé,

– la séquence SEQ ID NO : 5, représentant un variant d'épissage CD25B3 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 353 est phosphorylé,

– la séquence SEQ ID NO : 6, représentant un variant d'épissage CD25B4 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 374 est phosphorylé,

– la séquence SEQ ID NO : 7, représentant un variant d'épissage CD25B5 de la protéine d'origine humaine de la phosphatase CDC25B, dont le résidu sérine en position 361 est phosphorylé.

4. Anticorps polyclonal ou monoclonal susceptible de reconnaître une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

5. Anticorps polyclonal susceptible de reconnaître la séquence SEQ ID NO : 2 telle que définie dans la revendication 2.

6. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal selon la revendication 4, dirigé contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie dans la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

– l'immunisation d'un animal par injection de la séquence peptidique selon la revendication 2,

– la fusion entre des myélomes d'un animal et des splénocytes d'un animal afin d'obtenir des hybridomes,

– la mise en culture des hybridomes ainsi obtenus,

– la récupération et purification par clonage d'un hybridome, choisi parmi ceux obtenus à l'étape précédente et sécrétant un anticorps dirigé contre la séquence peptidique selon la revendication 2.

7. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, un anticorps selon la revendication 4 ou 5, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

8. Utilisation d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de cancers, tels que les cancers du sein.

9. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou pronostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal, notamment de cancers du sein.

4. Anticorps polyclonal ou monoclonal susceptible de reconnaître une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

5. Anticorps polyclonal susceptible de reconnaître la séquence SEQ ID NO : 2 telle que définie dans la revendication 2.

6. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal selon la revendication 4, dirigé contre la séquence peptidique SEQ ID NO : 2 telle que définie dans la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la fusion entre des myélomes d'un animal et des splénocytes d'un animal immunisé par injection de la séquence peptidique selon la revendication 2, afin d'obtenir des hybridomes,
- la mise en culture des hybridomes ainsi obtenus,
- la récupération et purification par clonage d'un hybridome, choisi parmi ceux obtenus à l'étape précédente et sécrétant un anticorps dirigé contre la séquence peptidique selon la revendication 2.

7. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient à titre de substance active une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, un anticorps selon la revendication 4 ou 5, en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

8. Utilisation d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de cancers, tels que les cancers du sein.

9. Utilisation d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou pronostic *in vitro* de cancers chez l'homme ou l'animal, notamment de cancers du sein.



10. Méthode de diagnostic ou pronostic *in vitro* de cancers, notamment de cancers du sein, chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

– la mise en présence d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5, avec un échantillon biologique prélevé chez un individu, ledit anticorps étant le cas échéant fixé sur un support solide,

– la détection d'une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique à l'aide de réactifs marqués, notamment d'anticorps marqués, reconnaissant soit l'anticorps lié à ladite séquence peptidique, soit la séquence peptidique liée audit anticorps dans les complexes formés lors de l'étape précédente entre l'anticorps et la séquence peptidique susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et ce, le cas échéant, après rinçage approprié du support solide.

11. Procédé de criblage d'une molécule capable de se lier à une séquence peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ladite molécule étant susceptible d'être utilisée comme agent anti-tumoral ou agent anti-prolifératif, caractérisé en ce qu'il comprend :

– la mise en présence de ladite molécule avec la séquence peptidique susmentionnée, et

– la détection de la liaison de ladite molécule par l'utilisation de méthodes de compétition appropriées, notamment par la compétition vis-à-vis de la liaison d'un anticorps selon la revendication 4 ou 5.

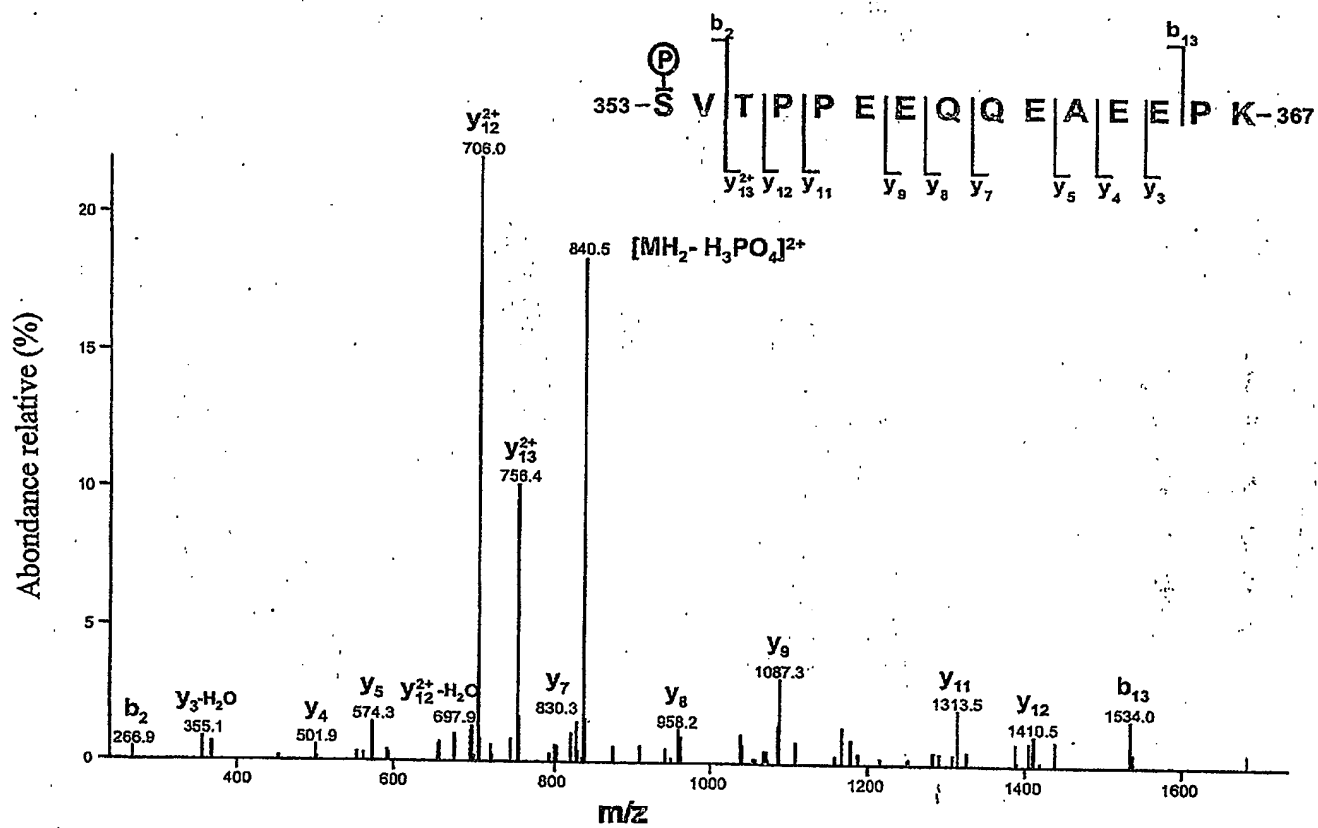


FIGURE 1

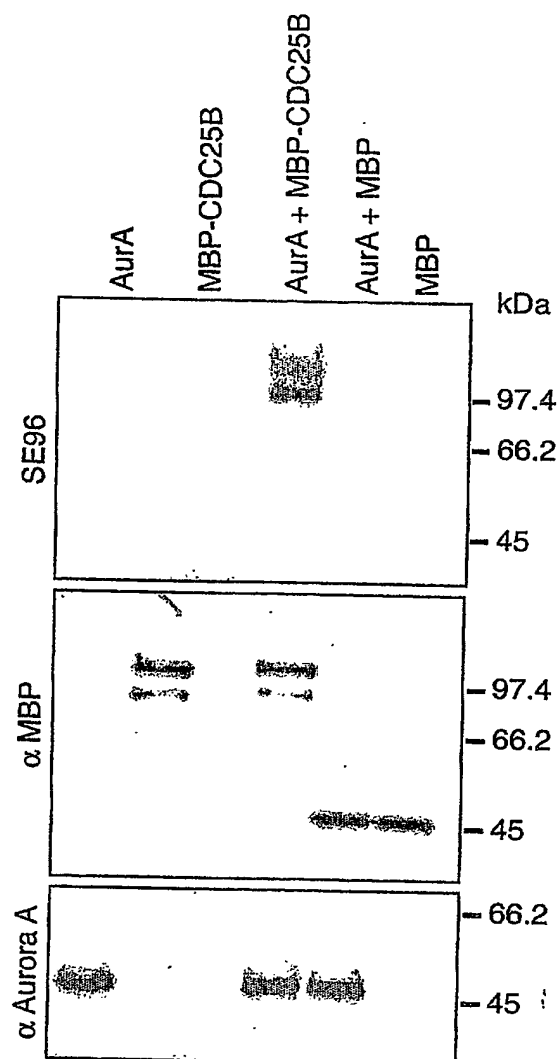
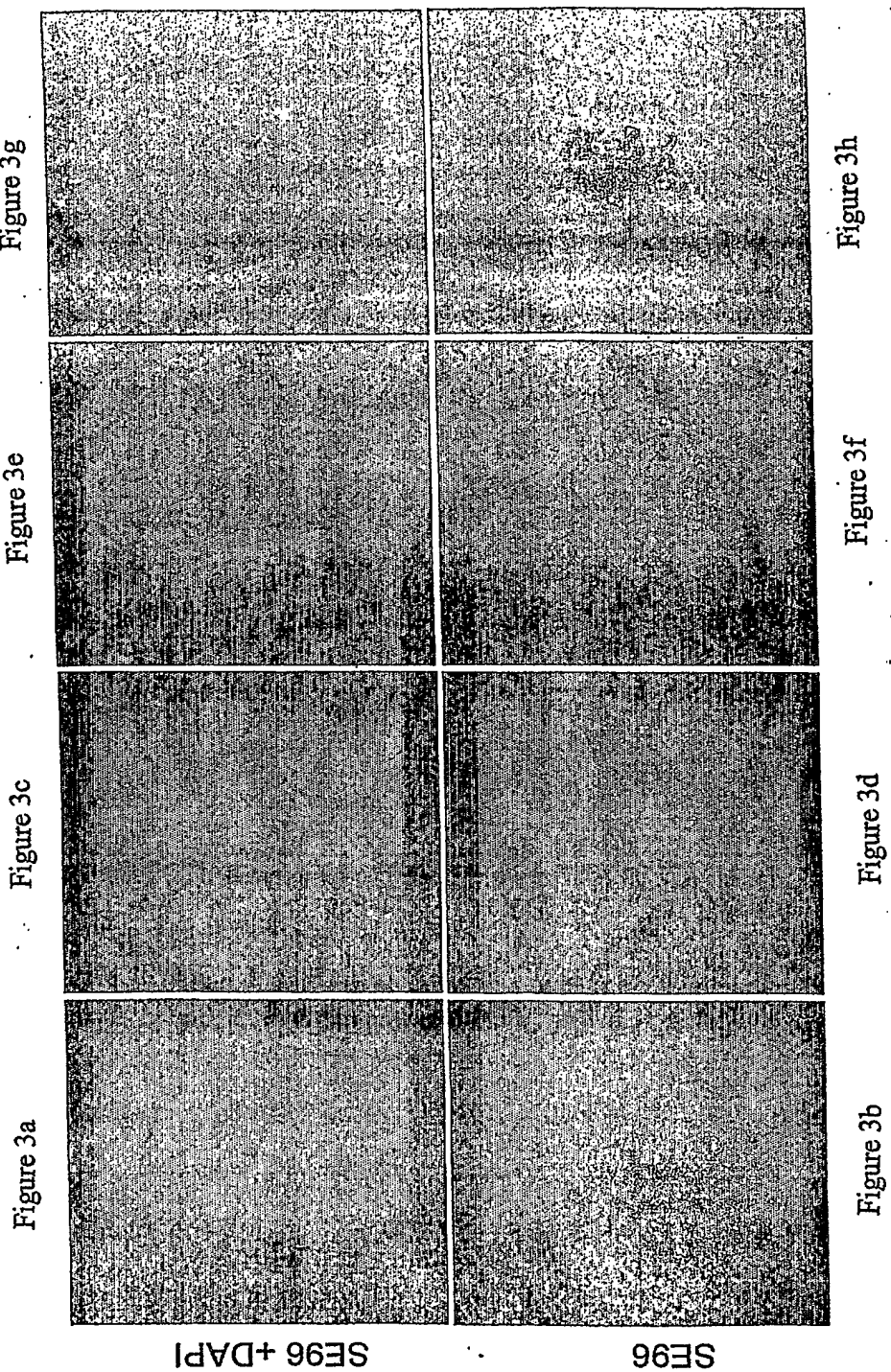


FIGURE 2



LISTE DE SEQUENCES

<110> CNRS  
UNIVERSITE DE RENNES I

<120> NOUVELLES SEQUENCES PHOSPHORYLEES DE LA PHOSPHATASE CD25B,  
ANTICORPS DIRIGES CONTRE CES SEQUENCES AINSI QUE  
LEUR UTILISATION

<130> IFB 03 BH CNR CD25

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> homo sapiens

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> PHOSPHORYLATION

<400> 1  
Thr Pro Val Gln Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu  
1 5 10 15

Gln Gln Glu

<210> 2  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> homo sapiens

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)..(7)  
<223> PHOSPHORYLATION

<400> 2  
Gln Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln  
1 5 10

<210> 3  
<211> 566  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (339)..(339)  
<223> PHOSPHORYLATION

<400> 3  
Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro  
1 5 10 15

Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu  
 20 25 30  
 Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala  
 35 40 45  
 Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly  
 50 55 60  
 Leu Gly Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala  
 65 70 75 80  
 Ser Glu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly  
 85 90 95  
 Leu Cys Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln  
 100 105 110  
 Thr Phe Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu  
 115 120 125  
 Gln Phe Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Val Arg Leu Leu Gly  
 130 135 140  
 His Ser Pro Val Leu Arg Asn Ile Thr Asn Ser Gln Ala Pro Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Arg Arg Lys Ser Glu Ala Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Ser Gly Glu  
 165 170 175  
 Asp Lys Glu Asn Asp Gly Phe Val Phe Lys Met Pro Trp Lys Pro Thr  
 180 185 190  
 His Pro Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp Ala Ser Arg Arg Glu  
 195 200 205  
 Ala Phe Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met Cys Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Asp Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser Pro Leu Ala Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Arg Phe Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr Glu Glu Asp Asp Gly  
 245 250 255  
 Phe Val Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp Asp Asp Ala Val Pro  
 260 265 270  
 Pro Gly Met Glu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Leu Val Lys Thr Leu Glu  
 275 280 285  
 Lys Glu Glu Glu Lys Asp Leu Val Met Tyr Ser Lys Cys Gln Arg Leu  
 290 295 300  
 Phe Arg Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val Ile Arg Pro Ile Leu Lys  
 305 310 315 320  
 Arg Leu Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr Pro Val Gln Asn Lys Arg  
 325 330 335

Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln Gln Glu Ala Glu Glu Pro  
 340 345 350

Lys Ala Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu Cys His Asp Glu Ile Glu  
 355 360 365

Asn Leu Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu Ile Gly Asp Tyr Ser Lys  
 370 375 380

Ala Phe Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys His Gln Asp Leu Lys Tyr  
 385 390 395 400

Ile Ser Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu Thr Gly Lys Phe Ser Asn  
 405 410 415

Ile Val Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys Arg Tyr Pro Tyr Glu Tyr  
 420 425 430

Glu Gly Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn Leu Pro Leu Glu Arg Asp  
 435 440 445

Ala Glu Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile Ala Pro Cys Ser Leu Asp  
 450 455 460

Lys Arg Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu Phe Ser Ser Glu Arg Gly  
 465 470 475 480

Pro Arg Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg Asp Arg Ala Val Asn Asp  
 485 490 495

Tyr Pro Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr Ile Leu Lys Gly Gly Tyr  
 500 505 510

Lys Glu Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe Cys Glu Pro Gln Asp Tyr  
 515 520 525

Arg Pro Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp Glu Leu Lys Thr Phe Arg  
 530 535 540

Leu Lys Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg Ser Arg Arg Glu Leu Cys  
 545 550 555 560

Ser Arg Leu Gln Asp Gln  
 565

<210> 4  
 <211> 539  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (312)..(312)  
 <223> PHOSPHORYLATION

<400> 4  
 Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro  
 1 5 10 15

Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu  
 20 25 30  
 Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala  
 35 40 45  
 Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly  
 50 55 60  
 Leu Gly Ser Glu Thr Pro Lys Ser Gln Val Gly Thr Leu Leu Phe Arg  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala Ser Glu  
 85 90 95  
 Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly Leu Cys  
 100 105 110  
 Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln Thr Phe  
 115 120 125  
 Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu Gln Phe  
 130 135 140  
 Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Asp Gly Phe Val Phe Lys Met  
 145 150 155 160  
 Pro Trp Lys Pro Thr His Pro Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp  
 165 170 175  
 Ala Ser Arg Arg Glu Ala Phe Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp  
 180 185 190  
 Leu Met Cys Leu Ser Pro Asp Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser  
 195 200 205  
 Pro Leu Ala Leu Gly Arg Phe Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr  
 210 215 220  
 Glu Glu Asp Asp Gly Phe Val Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp  
 225 230 235 240  
 Asp Asp Ala Val Pro Pro Gly Met Glu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Leu  
 245 250 255  
 Val Lys Thr Leu Glu Lys Glu Glu Glu Lys Asp Leu Val Met Tyr Ser  
 260 265 270  
 Lys Cys Gln Arg Leu Phe Arg Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val Ile  
 275 280 285  
 Arg Pro Ile Leu Lys Arg Leu Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr Pro  
 290 295 300  
 Val Gln Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln Gln  
 305 310 315 320  
 Glu Ala Glu Glu Pro Lys Ala Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu Cys  
 325 330 335



His Asp Glu Ile Glu Asn Leu Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu Ile  
 340 345 350  
 Gly Asp Tyr Ser Lys Ala Phe Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys His  
 355 360 365  
 Gln Asp Leu Lys Tyr Ile Ser Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu Thr  
 370 375 380  
 Gly Lys Phe Ser Asn Ile Val Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys Arg  
 385 390 395 400  
 Tyr Pro Tyr Glu Tyr Glu Gly Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn Leu  
 405 410 415  
 Pro Leu Glu Arg Asp Ala Glu Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile Ala  
 420 425 430  
 Pro Cys Ser Leu Asp Lys Arg Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu Phe  
 435 440 445  
 Ser Ser Glu Arg Gly Pro Arg Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg Asp  
 450 455 460  
 Arg Ala Val Asn Asp Tyr Pro Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr Ile  
 465 470 475 480  
 Leu Lys Gly Gly Tyr Lys Glu Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe Cys  
 485 490 495  
 Glu Pro Gln Asp Tyr Arg Pro Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp Glu  
 500 505 510  
 Leu Lys Thr Phe Arg Leu Lys Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg Ser  
 515 520 525  
 Arg Arg Glu Leu Cys Ser Arg Leu Gln Asp Gln  
 530 535

<210> 5  
 <211> 580  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (353)..(353)  
 <223> PHOSPHORYLATION

<400> 5  
 Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu  
 20 25 30  
 Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala  
 35 40 45

Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly  
 50 55 60  
 Leu Gly Ser Glu Thr Pro Lys Ser Gln Val Gly Thr Leu Leu Phe Arg  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala Ser Glu  
 85 90 95  
 Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly Leu Cys  
 100 105 110  
 Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln Thr Phe  
 115 120 125  
 Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu Gln Phe  
 130 135 140  
 Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Val Arg Leu Leu Gly His Ser  
 145 150 155 160  
 Pro Val Leu Arg Asn Ile Thr Asn Ser Gln Ala Pro Asp Gly Arg Arg  
 165 170 175  
 Lys Ser Glu Ala Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Ser Gly Glu Asp Lys  
 180 185 190  
 Glu Asn Asp Gly Phe Val Phe Lys Met Pro Trp Lys Pro Thr His Pro  
 195 200 205  
 Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp Ala Ser Arg Arg Glu Ala Phe  
 210 215 220  
 Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met Cys Leu Ser Pro Asp  
 225 230 235 240  
 Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser Pro Leu Ala Leu Gly Arg Phe  
 245 250 255  
 Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr Glu Glu Asp Asp Gly Phe Val  
 260 265 270  
 Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp Asp Asp Ala Val Pro Pro Gly  
 275 280 285  
 Met Glu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Leu Val Lys Thr Leu Glu Lys Glu  
 290 295 300  
 Glu Glu Lys Asp Leu Val Met Tyr Ser Lys Cys Gln Arg Leu Phe Arg  
 305 310 315 320  
 Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val Ile Arg Pro Ile Leu Lys Arg Leu  
 325 330 335  
 Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr Pro Val Gln Asn Lys Arg Arg Arg  
 340 345 350  
 Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln Gln Glu Ala Glu Glu Pro Lys Ala  
 355 360 365

Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu Cys His Asp Glu Ile Glu Asn Leu  
 370 375 380  
 Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu Ile Gly Asp Tyr Ser Lys Ala Phe  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys His Gln Asp Leu Lys Tyr Ile Ser  
 405 410 415  
 Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu Thr Gly Lys Phe Ser Asn Ile Val  
 420 425 430  
 Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys Arg Tyr Pro Tyr Glu Tyr Glu Gly  
 435 440 445  
 Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn Leu Pro Leu Glu Arg Asp Ala Glu  
 450 455 460  
 Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile Ala Pro Cys Ser Leu Asp Lys Arg  
 465 470 475 480  
 Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu Phe Ser Ser Glu Arg Gly Pro Arg  
 485 490 495  
 Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg Asp Arg Ala Val Asn Asp Tyr Pro  
 500 505 510  
 Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr Ile Leu Lys Gly Gly Tyr Lys Glu  
 515 520 525  
 Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe Cys Glu Pro Gln Asp Tyr Arg Pro  
 530 535 540  
 Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp Glu Leu Lys Thr Phe Arg Leu Lys  
 545 550 555 560  
 Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg Ser Arg Arg Glu Leu Cys Ser Arg  
 565 570 575  
 Leu Gln Asp Gln  
 580

<210> 6  
 <211> 601  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (374)..(374)  
 <223> PHOSPHORYLATION

<400> 6  
 Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu  
 20 25 30

Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala  
 35 40 45  
 Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly  
 50 55 60  
 Leu Gly Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala  
 65 70 75 80  
 Ser Glu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly  
 85 90 95  
 Leu Cys Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln  
 100 105 110  
 Thr Phe Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu  
 115 120 125  
 Gln Phe Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Val Arg Leu Leu Gly  
 130 135 140  
 His Ser Pro Val Leu Arg Asn Ile Thr Asn Ser Gln Ala Pro Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Arg Arg Lys Ser Glu Ala Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Ser Gly Glu  
 165 170 175  
 Asp Lys Glu Asn Val Arg Phe Trp Lys Ala Gly Val Gly Ala Leu Arg  
 180 185 190  
 Glu Glu Glu Gly Ala Cys Trp Gly Gly Ser Leu Ala Cys Glu Asp Pro  
 195 200 205  
 Pro Leu Pro Ser Trp Leu Gln Asp Gly Phe Val Phe Lys Met Pro Trp  
 210 215 220  
 Lys Pro Thr His Pro Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp Ala Ser  
 225 230 235 240  
 Arg Arg Glu Ala Phe Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met  
 245 250 255  
 Cys Leu Ser Pro Asp Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser Pro Leu  
 260 265 270  
 Ala Leu Gly Arg Phe Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr Glu Glu  
 275 280 285  
 Asp Asp Gly Phe Val Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp Asp Asp  
 290 295 300  
 Ala Val Pro Pro Gly Met Glu Ser Leu Ile Ser Ala Pro Leu Val Lys  
 305 310 315 320  
 Thr Leu Glu Lys Glu Glu Glu Lys Asp Leu Val Met Tyr Ser Lys Cys  
 325 330 335  
 Gln Arg Leu Phe Arg Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val Ile Arg Pro  
 340 345 350

Ile Leu Lys Arg Leu Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr Pro Val Gln  
 355 360 365  
 Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln Gln Glu Ala  
 370 375 380  
 Glu Glu Pro Lys Ala Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu Cys His Asp  
 385 390 395 400  
 Glu Ile Glu Asn Leu Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu Ile Gly Asp  
 405 410 415  
 Tyr Ser Lys Ala Phe Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys His Gln Asp  
 420 425 430  
 Leu Lys Tyr Ile Ser Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu Thr Gly Lys  
 435 440 445  
 Phe Ser Asn Ile Val Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys Arg Tyr Pro  
 450 455 460  
 Tyr Glu Tyr Glu Gly Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn Leu Pro Leu  
 465 470 475 480  
 Glu Arg Asp Ala Glu Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile Ala Pro Cys  
 485 490 495  
 Ser Leu Asp Lys Arg Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu Phe Ser Ser  
 500 505 510  
 Glu Arg Gly Pro Arg Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg Asp Arg Ala  
 515 520 525  
 Val Asn Asp Tyr Pro Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr Ile Leu Lys  
 530 535 540  
 Gly Gly Tyr Lys Glu Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe Cys Glu Pro  
 545 550 555 560  
 Gln Asp Tyr Arg Pro Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp Glu Leu Lys  
 565 570 575  
 Thr Phe Arg Leu Lys Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg Ser Arg Arg  
 580 585 590  
 Glu Leu Cys Ser Arg Leu Gln Asp Gln  
 595 600

<210> 7  
 <211> 588  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (361)..(361)  
 <223> PHOSPHORYLATION

&lt;400&gt; 7

Met Glu Val Pro Gln Pro Glu Pro Ala Pro Gly Ser Ala Leu Ser Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Val Cys Gly Gly Ala Gln Arg Pro Gly His Leu Pro Gly Leu  
 20 25 30  
 Leu Leu Gly Ser His Gly Leu Leu Gly Ser Pro Val Arg Ala Ala Ala  
 35 40 45  
 Ser Ser Pro Val Thr Thr Leu Thr Gln Thr Met His Asp Leu Ala Gly  
 50 55 60  
 Leu Gly Ser Glu Thr Pro Lys Ser Gln Val Gly Thr Leu Leu Phe Arg  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Ser Arg Leu Thr His Leu Ser Leu Ser Arg Arg Ala Ser Glu  
 85 90 95  
 Ser Ser Leu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Asp Ala Gly Leu Cys  
 100 105 110  
 Met Asp Ser Pro Ser Pro Met Asp Pro His Met Ala Glu Gln Thr Phe  
 115 120 125  
 Glu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Ser Arg Ile Ile Arg Asn Glu Gln Phe  
 130 135 140  
 Ala Ile Arg Arg Phe Gln Ser Met Pro Val Arg Leu Leu Gly His Ser  
 145 150 155 160  
 Pro Val Leu Arg Asn Ile Thr Asn Ser Gln Ala Pro Asp Gly Arg Arg  
 165 170 175  
 Lys Ser Glu Ala Gly Ser Gly Ala Ala Ser Ser Ser Gly Glu Asp Lys  
 180 185 190  
 Glu Asn Val Arg Phe Trp Lys Ala Gly Val Gly Ala Leu Arg Glu Glu  
 195 200 205  
 Glu Gly Ala Cys Trp Gly Gly Ser Leu Ala Cys Glu Asp Pro Pro Leu  
 210 215 220  
 Pro Ser Trp Leu Gln Asp Gly Phe Val Phe Lys Met Pro Trp Lys Pro  
 225 230 235 240  
 Thr His Pro Ser Ser Thr His Ala Leu Ala Glu Trp Ala Ser Arg Arg  
 245 250 255  
 Glu Ala Phe Ala Gln Arg Pro Ser Ser Ala Pro Asp Leu Met Cys Leu  
 260 265 270  
 Ser Pro Asp Arg Lys Met Glu Val Glu Glu Leu Ser Pro Leu Ala Leu  
 275 280 285  
 Gly Arg Phe Ser Leu Thr Pro Ala Glu Gly Asp Thr Glu Glu Asp Asp  
 290 295 300  
 Gly Phe Val Asp Ile Leu Glu Ser Asp Leu Lys Asp Leu Val Met Tyr  
 305 310 315 320

Ser Lys Cys Gln Arg Leu Phe Arg Ser Pro Ser Met Pro Cys Ser Val  
 325 330 335  
 Ile Arg Pro Ile Leu Lys Arg Leu Glu Arg Pro Gln Asp Arg Asp Thr  
 340 345 350  
 Pro Val Gln Asn Lys Arg Arg Arg Ser Val Thr Pro Pro Glu Glu Gln  
 355 360 365  
 Gln Glu Ala Glu Glu Pro Lys Ala Arg Val Leu Arg Ser Lys Ser Leu  
 370 375 380  
 Cys His Asp Glu Ile Glu Asn Leu Leu Asp Ser Asp His Arg Glu Leu  
 385 390 395 400  
 Ile Gly Asp Tyr Ser Lys Ala Phe Leu Leu Gln Thr Val Asp Gly Lys  
 405 410 415  
 His Gln Asp Leu Lys Tyr Ile Ser Pro Glu Thr Met Val Ala Leu Leu  
 420 425 430  
 Thr Gly Lys Phe Ser Asn Ile Val Asp Lys Phe Val Ile Val Asp Cys  
 435 440 445  
 Arg Tyr Pro Tyr Glu Tyr Glu Gly Gly His Ile Lys Thr Ala Val Asn  
 450 455 460  
 Leu Pro Leu Glu Arg Asp Ala Glu Ser Phe Leu Leu Lys Ser Pro Ile  
 465 470 475 480  
 Ala Pro Cys Ser Leu Asp Lys Arg Val Ile Leu Ile Phe His Cys Glu  
 485 490 495  
 Phe Ser Ser Glu Arg Gly Pro Arg Met Cys Arg Phe Ile Arg Glu Arg  
 500 505 510  
 Asp Arg Ala Val Asn Asp Tyr Pro Ser Leu Tyr Tyr Pro Glu Met Tyr  
 515 520 525  
 Ile Leu Lys Gly Gly Tyr Lys Glu Phe Phe Pro Gln His Pro Asn Phe  
 530 535 540  
 Cys Glu Pro Gln Asp Tyr Arg Pro Met Asn His Glu Ala Phe Lys Asp  
 545 550 555 560  
 Glu Leu Lys Thr Phe Arg Leu Lys Thr Arg Ser Trp Ala Gly Glu Arg  
 565 570 575  
 Ser Arg Arg Glu Leu Cys Ser Arg Leu Gln Asp Gln  
 580 585

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

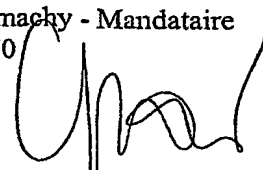
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° .\./.\.  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		IFB 03 BH CNR CD25
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		03/007095
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
NOUVELLES SEQUENCES PHOSPHORYLEES DE LA PHOSPHATASE CD25B, ANTICORPS DIRIGES CONTRE CES SEQUENCES AINSI QUE LEUR UTILISATION		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 3, rue Michel-Ange F-75794 PARIS CEDEX 16, France, et		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
<b>Nom</b>		DUCOMMUN
<b>Prénoms</b>		Bernard
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	1, Chemin du Paradis
	<b>Code postal et ville</b>	31450 BELBERAUD
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)		
<b>Nom</b>		MONSARRAT
<b>Prénoms</b>		Bernard
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	13, rue du Colonel H. Manhes
	<b>Code postal et ville</b>	81000 ALBI
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)		
<b>Nom</b>		PRIGENT
<b>Prénoms</b>		Claude
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	1, rue Angéla Duval
	<b>Code postal et ville</b>	35235 THORIGNE-FOUILLARD
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 1 <sup>er</sup> août 2003  Charles Demachy - Mandataire 422.5/PP170 P.O. 



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**